Über die Fermentative Synthese von Glycerinestern.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der Philosophischen Fakultät

der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin.

Vorgelegt

von

Sarah Ginsburg

aus Leningrad

Tag der mündl. Prüfung: 16. November 1933

Tag der Promotion: 9. Mai 1934

317

Referenten: Professor Dr. W. Schlenk.

Professor Dr. M. Bodenstein.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber die Fermentative Synthese von Glycerinestern.

A. Kurzer geschichtlicher Ueberblick über das Gebiet der Glycerinestersynthesen.

B. Hauptteil.

I. Untersuchung der Bedingungen der fermentativen Synthese von Glycerinestern.

a) Versuche über die Wirksamkeit von Schweine-Pankreas-Trockenpulver in Abhängigkeit von:

1. Säurekonzentration.
2. Fermentkonzentration.
3. Wassermenge.

Gang der Synthese; Synthese mit Palmitin- und Stearinsäuren.

b) Versuche über die Wirksamkeit von Glycerinrohextrakten. (Unters. n. d. Gesichtspunkten w. o.)

c) Versuche mit Eluaten (desgl.)
Vergleiche dreier Eluaten von verschiedenen Reinheitsgraden.

II. Untersuchung der fermentativ gebildeten Oelsäureglycerinester.

a) Allgemeines über die Trennungsmöglichkeiten des Estergemisches.

b) Darstellung der Ester auf chemischem Wege.
α-Monoolein, α, β- Diolein, Triolein.

c) Analyse der ferm. Ester.

d) Trennung des Estergemisches.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550810_0009

Geschichtlicher Überblick.

Die Wirkung der Lipasen ist lange bekannt und sehr genau besonders von der Willstätterschen Schule erforscht worden.

Die Fettspaltung als katalytischer Vorgang, der zu einem chemischen Gleichgewicht führt, ist nach dem Massenwirkungsgesetz als reversibel zu betrachten, und es ergab sich deshalb die Aufgabe, nicht nur die Bedingungen für eine möglichst weitgehende fermentative Spaltung der Ester zu finden, sondern auch zu untersuchen, welche die günstigsten Synthesebedingungen sind.

Die ersten Versuche in dieser Richtung beschäftigen sich mit den Synthesen von Glycerinestern, da die Entstehung der physiologisch so wichtigen Tier- und Pflanzenfette auf chemischem Wege erforscht und nachgemacht werden sollte.

Die frühesten Arbeiten auf diesem Gebiet stammen aus dem Anfang dieses Jahrhunderts. Allerdings sind sie noch sehr unsystematisch und, wie die betreffenden Forscher selbst sagen, noch sehr unbefriedigend. Hanriot*) z. B. benutzte als Substrat eine wässerige Lösung mit nur 4 % Glycerin und 1,6 % iso-Buttersäure, als Ferment Blutserum, dessen Ursprung nicht angegeben ist. Der Verfasser gibt an, nach 90 min. 54 % Synthese von Säureester verzeichnen zu können. In weiteren Versuchen werden innerhalb von 30 min. durch Variation der Acidität Synthesen bis zu 40 % erreicht. Auch den gebildeten Buttersäureester glaubt der Verfasser isoliert zu haben. Weiter gibt Hanriot an, daß die Lipasen auch die Schwefel-, Salz-, Oxal- und Ameisensäure mit Glycerin zu verestern vermögen.

*) C. r. 132, 212 (1901). C. r. d. l. soc. d. Biol. 53, 70 (1901).

Wir haben die Arbeit von Hanriot nachgemacht unter Benutzung von Ziegenblutserum als Ferment. Jedoch konnten wir die Ergebnisse nicht bestätigen, sondern wir bekamen selbst nach 24 Stunden keine Ester. Abgesehen aber davon, daß nach unserem heutigen Wissen über den Mechanismus der Estersynthesen ein so großer Wasserüberschuß, wie ihn Hanriot verwendet, die Synthesen ungemein verschlechtert, resp. unmöglich macht, die angegebenen Ausbeuten also schon sehr unwahrscheinlich sind, sind Ameisen- und Oxalsäuren spezifische Fermentgifte, für die Synthese also von vorneherein unbrauchbar.

Pottevin†) vereinigte Glycerin-Rohextrakte von Schweinepankreas mit Ölsäure. Er nahm ungefähr gleiche Mengen Glycerin und Säure. Nach 8 Tagen verzeichnete er ca. 30 % Ester. Den gebildeten Ester wollte er als Monoolein identifiziert haben. Die Wege, die er dabei einschlug, sind nicht angegeben. Bei der Verseifung dieses Esters ergab sich dasselbe Gleichgewicht, wie bei der Synthese.

In einer darauffolgenden Arbeit††) verestert der Verfasser das so gewonnene Monoolein weiter mit einem großen Überschuß von Ölsäure in Gegenwart von Schweinepankreaspulver. Er behauptet, Triolein bekommen zu haben.

Bradley †††) erwähnt kurz die Reversibilität der Lipasewirkung. Er synthetisierte Ölsäureglycerid aus Glycerin mit Ölsäure und erreichte Werte bis zu 28 % Ester. Insbesondere betont er die Wirkung von großen Wassermengen auf die Synthese; bei mehr als 50 % Wassergehalt tritt beinahe vollständige Hydrolyse ein.

In der Arbeit von Armstrong und Gosney ††††) werden die Gleichgewichte bei Hydrolyse und Synthese untersucht. Nach 70 Stunden waren ca. 38 % synthetisiert, entsprechend den 62 %, die bei der Hydrolyse gefunden waren. Beide Vorgänge, Hydrolyse sowie Synthese, sollen durch über-

†) C. r. 136, 1152 (1903).
††) Daselbst 138, 378 (1904).
†††) J. of Biol. Chem. 8, 251 (1910).
††††) Proc. Roy. Soc. 88, 176 (1914).

schüssiges Glycerin gehemmt werden. Eine gewisse Menge Wasser ist für die Synthese unbedingt notwendig. Über die Konstitution des gebildeten Esters sind sich die Autoren nicht schlüssig; es werden Gemische der verschiedenen Arten vermutet.

Bournot *) geht von verhältnismäßig großen Ölsäuremengen gegenüber dem Glycerin aus. Mit trockenem Pankreascystenrückstand als Ferment bekommt er maximale Synthesen von 42 % in 11 Tagen, mit Chilidoniumsamen schon in 5 Stunden 50 %.

Kransz **) weist auf die schädliche Wirkung der Ölsäure hin und empfiehlt die Verwendung von Glycerinüberschuß; die gebildeten Ester hält er für ein Gemisch aller drei Stufen.

Einen wesentlichen Fortschritt bilden die Arbeiten von Hamsik ***), in denen er das Gebiet der Estersynthesen von Glycerin etwas systematischer behandelt. Als Ferment wurden das Schweinepankreastrockenpulver sowie der Rohextrakt davon benutzt, als Säuren Öl-, Palmitin-, Stearinsäure. Die Dosierung betrug 5 ccm Ölsäure auf 10 ccm Glycerin. Es wurde nach 10 Tagen ca. 30—35 % Ester erzielt. Der Verfasser weist darauf hin, daß Extrakte weniger wirksam sind, als die entsprechende Menge Trockenpulver, außerdem, daß die Palmitin- und Stearinsäure schlechter als Ölsäure verestert werden, Buttersäure ganz besonders schlecht. In der Arbeit über den Einfluß der Galle auf die Fettsynthesen erwähnt er die schädliche Wirkung der starken Aciditität.

Diese Aufzählung der bisherigen Arbeiten über die fermentativen Synthesen von Glycerinestern zeigt bereits, wie lückenhaft und widerspruchsvoll die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten untereinander sind. Während Pottevin angibt, daß erst nach vollständiger Bildung von Monoester die weitere Veresterung in Di- und Triester erfolgt, nehmen andere Autoren die gleichzeitige Anwesenheit von unverändertem Glycerin

*) Bio. Z. 52, 166, 181.
**) Zeitschrift ang. Chem. 24, 829.
***) Zeitschr. phys. Chem. 59 (1909), 65, 232 (1910), 71, 238 (1911).

und den drei Esterstufen an. Über den Einfluß der Säurekonzentration gehen die Meinungen gleichfalls auseinander. Die so wichtige Frage der Fermentkonzentration und der Anwendungsform des Ferments werden überhaupt nicht behandelt.

Bei der großen Bedeutung die gerade auch vom physiologischen Standpunkt aus die fermentative Synthese von Glycerinestern hat, hielten wir es deshalb für angebracht, die Unstimmigkeiten und Lücken durch eine systematische Untersuchung zu beseitigen und darüber hinaus die günstigsten Bedingungen für eine möglichst vollständige Veresterung zu finden.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Verlauf der Synthese in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen, der zweite Teil behandelt die Untersuchung der gebildeten Säureester, vor allem ihre Zusammensetzung und Eigenschaften im Vergleich mit den chemisch gebildeten Ester.

I. Untersuchung der Bedingungen der fermentativen Synthese von Glycerinestern.

Von ausschlaggebender Bedeutung für eine fermentative Synthese ist naturgemäß das Fermentmaterial. Wegen der besonders starken lipolytischen Fähigkeit der Glycerinextrakte der Organe untersuchten wir zuerst den Verlauf der Synthese mit Schweinepankreastrockenpulver und gingen dann zu Versuchen mit Glycerinextrakten und Eluaten über, um im homogenen System mit gereinigtem Ferment den Verlauf der Synthese festlegen zu können. Als Säuren, die wir zur Veresterung brachten, verwandten wir Butter- und Oelsäure.

a) Synthese von Glycerinestern mit Hilfe von Schweinepankreastrockenpulver. (Herst. d. Organ-Präp. s. exp. Teil).

Anfangs gingen wir in der Weise vor, daß wir eine Buttersäurekonzentration von ca. n/10 wählten; entsprechende Mengen wurden auch von Oelsäure genommen. Die Ansätze waren wie folgt: 50 ccm Glycerin, 0,5 ccm n-Buttersäure und 0,5 g Schweinepankreastrockenpulver, bzw. 10 ccm Glycerin, 0,3 ccm Oelsäure und 0,1 g Schweinepankreastrockenpulver. Bei Oelsäure bekamen wir schon nach einem Tag 70 % Synthese, bei Buttersäure unter diesen Bedingungen jedoch keine. Erst nach längerem Schütteln, nach 3—4 Tagen bekamen wir bei Buttersäure meßbare, aber doch nur sehr geringe Synthesen. Wir gingen daher mit der Säurekonzentration erheblich herunter und bekamen dann bei 0,1—0,2 ccm n-Buttersäure auf 50 ccm Glycerin befriedigende Resultate.

Der Einfluß der Säurekonzentration auf die Synthese ist aus den Tabellen 1 und 2 zu ersehen.

Tabelle 1

75 ccm Glycerin (87 %)
0,15 — 0,75 ccm Buttersäure (ca. n/50-n/10)
0,75 g Schweinepankreastrockenpulver (ca. 1 %)

Beim Schütteln des Fermentpulvers mit dem Glycerin wurden folgende Titrationswerte gefunden:

Zeit	auf 20 g Glycerin, i. ccm n/20 NaOH	a. 10 g G. i. ccm n/10 NaOH
sofort	1,16	0,29

Diese Werte wurden als Korrektur von dem Gesamttitrationswert abgezogen und so der auf die Buttersäure fallende Wert errechnet.

Säure in ccm	0,15		0,30		0,45		0,60		0,75	
Einw. d. Gem. i. g. Zeit O.	19,8	26,4	25,8	22,0	10,87	12,93	9,75	10,57	10,42	8,38
Verbr. NaOH in ccm *	8,04	10,51	20,38	16,72	6,27	7,42	7,21	8,01	9,80	7,94
NaOH a. 20 g bzw. 10 g Gem. **	8,12	7,96	15,80	15,20	5,77	5,74	7,39	7,58	9,40	9,48
NaOH n. d. Kor. in ccm	6,96	6,80	14,64	14,04	5,48	5,45	7,10	7,29	9,11	9,19
Einw. d. Gem. in g Zeit 2 Tage	25,0	30,8	32,0	34,6	15,84	16,47	9,14	11,59	8,89	8,24
Verbr. NaOH in ccm *	4,80	5,62	14,91	15,78	7,40	7,68	6,24	8,14	7,90	7,43
NaOH a. 20 bzw. 10 g Gem. **	3,84	3,65	9,32	9,12	4,67	4,66	6,83	7,02	8,89	9,02
NaOH n. d. Kor. in ccm	2,00	1,81	7,48	7,28	4,21	4,20	6,37	6,56	8,43	8,56
Einw. d. Gem i. g. Zt. 4 Tg.	32,2	34,0	23,1	22,8	10,19	11,53	9,84	10,88	9,10	9,43
Verbr. NaOH in ccm *	5,92	6,53	9,01	8,62	4,56	4,91	6,40	7,41	7,46	8,36
NaOH a. 20 bzw. 10 g Gem. **	3,68	3,84	7,80	7,56	4,23	4,26	6,50	6,81	8,20	8,87
NaOH n. d. Kor. in ccm	1,84	2,00	5,96	5,72	3,77	3,80	6,04	6,35	7,74	8,41

*) Die Buttersäure wurde teils mit n/20 NaOH (bei 0,15 — 0,30 ccm Buttersäure) teils mit n/10 NaOH (bei 0,45—0,75 ccm Buttersäure) titriert.

**) Berechnet wurde bei 0,15—0,30 ccm Buttersäure auf 20 g Glycerin, 0.45—0,75 ccm auf 10 g Glycerin.

Säure in ccm	0,15		0,30		0,45		0,60		0,75	
Synth. n. 2 Tg. in % [1]	71,3	73,4	48,9	48,1	23,5	22,9	12,8	10,0	7,5	6,9
Synth. n. 4 Tg. in % [1]	73,6	70,6	59,3	59,3	31,2	30,3	14,9	12,9	14,9	8,5
Mittelw. d. Syn. n. 2 Tg. in % [1]	72		48		23		11		7	
Mittelw. d. Syn. n. 4 Tg. in % [1]	72		59		31		13		12	

Tabelle 2

10 ccm Glycerin.
0,3—3,0 ccm Oelsäure.
0,1 g Schweinepankreastrockenpulver.

Beim Schütteln des Fermentpulvers mit dem Glycerin wurden folgende Titrationswerte gefunden:

nach 1—3 Tg. 0,70 ccm n/10 NaOH bzw. 0,14 n/2 NaOH.

Säure in ccm	0,3		1,0		2,0		3,0	
Grundtitr. d. Oelsäure i. ccm NaOH	9,25		30,80		12,33		18,50	
Verbr. d. NaOH in ccm n. 1 Tg. *	3,43	3,48	10,46	10,00	6,75	6,84	11,72	11,85
NaOH n. d. Kor. in ccm **	2,73	2,78	9,76	9,30	6,61	6,70	11,58	11,71
Verbr. NaOH in ccm nach 2 Tg. *	3,34	3,46	9,23	9,88	3,84	3,91	7,84	8,30
NaOH nach Kor. in ccm **	2,64	2,76	8,53	9,18	3,70	3,77	7,70	8,16
Verbr. NaOH in ccm nach 3 Tg. *	—	—	—	—	—	—	5,23	5,65
NaOH n. Kor. in ccm **	—	—	—	—	—	—	5,09	5,51

*) Die Oelsäure wurde teils mit n/10 NaOH (bei 0,3 — 1,0 ccm Oelsäure), teils mit n/2 b. 2,0—3,0 ccm Oelsäure titriert.

**) Diese Werte wurden als Korrektur von dem Gesamttitrationswert abgezogen und so der auf die Oelsäure fallende Wert errechnet.

[1] Bezogen auf die ursprüngliche Buttersäuremenge = 100.

Säure in ccm	0,3		1,0		2,0		3,0	
Synth. n. 1 Tg. in % [1]	70,5	69,9	68,3	69,8	48,0	45,7	37,4	36,7
Synth. n. 2 Tg. in % [1]	71,5	70,2	72,3	70,2	70,0	69,4	58,4	55,9
Synth. n. 3 Tg. in % [1]	—	—	—	—	—	—	72,5	70,2
Mittelw. d. Syn. n. 1 Tg. in % [1]	70		69		47		37	
Mittelw. d. Syn. n. 2 Tg. in % [1]	71		71		70		57	
Mittelw. d. Syn. n. 3 Tg. in % [1]	—		—		—		71	

Wir sehen, wie weit die Säurekonzentration von Einfluß auf die Synthese ist. Bei n-Buttersäure bekommt man Synthesen von 72%, wenn man 0,15 ccm Säure auf 75 ccm Glycerin nimmt. Bei 0,30 ccm Säure in der entsprechenden Menge Glycerin wird die Synthese schon geringer, bei 0,60—0,75 ccm Säure in 75 ccm Glycerin können nur ca. 10% Buttersäure zur Synthese gebracht werden.

Auch bei Oelsäure, obgleich sie in Glycerin unlöslich ist, kann die schädigende Wirkung der Säure beobachtet werden. Bei 3,0 ccm Oelsäure auf 10 ccm Glycerin bekommen wir nach einem Tag nur 37% Synthese gegen 70% Synthese bei geringeren Oelsäuremengen.

Bei stärkerer Acidität geht also die Synthese langsamer, strebt aber demselben Gleichgewicht zu.

Es entstand nun die Frage, ob das Ferment durch die freie Säure gehemmt oder geschädigt wird. Wir untersuchten die Wirkung von n-Buttersäure in Glycerin auf das Fermentpulver, indem wir einen Ansatz mit einer Säurekonzentration von ca. n/10 2 Tage im Brutschrank schüttelten, das Pulver abzentrifugierten mit Wasser wuschen und darauf mit Aceton und Aether trockneten Daneben wurde unter denselben Bedingungen die gleiche Menge Fermentpulver in Glycerin ohne Buttersäure angesetzt. Während

[1] Bezogen auf die ursprüngliche Oelsäuremenge = 100.

das mit Buttersäure geschüttelte Fermentpulver zum Teil zu dunklen Klumpen verharzt war, sah das andere vollkommen unverändert aus. Wir setzten mit beiden Trockenpulvern Synthesen mit 0,1 ccm n-Buttersäure auf 50 ccm Glycerin (ca. n/50) an.

Tabelle 3

	Trockenpulver ohne Buttersäure	Trockenpulver mit Buttersäure
Synt. n. 1 Tg. i. %	70	5

Wir sehen daraus, daß bei mit Buttersäure behandeltem Fermentpulver die synthetisierende Wirkung beinahe verschwindet, während das im reinen Glycerin geschüttelte Pulver seine synthetisierende Kraft beibehält.

Bei Synthesen von Glycerin mit n-Buttersäure liegen also die Verhältnisse so, daß größere Mengen freier Säure schädigend auf die Reaktion wirken.

Bei größeren Fermentkonzentrationen wirkt sich die schädigende Säurewirkung verständlicherweise nicht so stark aus. Bei 3-5fachen Fermentmengen bekommen wir bei 3 ccm Oelsäure auf 10 ccm Glycerin nach einem Tage schon 67 statt 37% Synthese (vgl. Tab. 2).

Neben den Säure- und Fermentkonzentrationen ist der Einfluß des Wassers von besonderer Bedeutung, dessen Schädlichkeit für die Synthese der Ester schon lange bekannt war.

Wir versuchten im wasserfreien Glycerin (D. 1,26) zu synthetisieren. Wir erhielten nur schechte Resultate, die aber durch Zusatz von Wasser wieder den guten Stand erreichten. Durch Zugabe größerer Mengen Wasser wurde die Synthese verlangsamt und das Gleichgewicht stark nach der Seite der Hydrolyse verschoben.

Der Einfluß des Wassers ist aus Tabelle 4 und 5 ersichtlich.

Tabelle 4

Volumen der Reaktionsflüssigkeit = 15 ccm Glycerin mit einem Wassergehalt von 0-52%.

0,3 ccm Oelsäure
0,15 g Schweinepankreastrockenpulver

Beim Schütteln des Fermentpulvers mit dem Glycerin wurden folgende Titrationswerte gefunden **):

Wassergeh. d. Glycerins i. %	0	7	13	20	30	38	52
Verbr. NaOH in ccm n. 1 Tg.	—	0,48	0,71	0,93	1,17	1,44	2,31
Verbr. NaOH in ccm n. 2 Tg.	0,23	0,56	0,69	1,01	1,40	1,79	2,42
Verbr. NaOH in ccm n. 4 Tg.	—	—	0,75	—	1,87	2,38	2,70

Berechnung der Synthesen

Wassergeh. d. Glyc. i/%	0		7		13		20		30		38		52	
Grundtitr. d. Oels. ccm NaOH	9,25													
Verbr. NaOH i. ccm n. 1 Tg.*	—	—	6,71	6,14	3,50	3,45	4,44	4,58	6,51	6,42	7,71	7,30	10,28	9,96
NaOH n. Kor. i. ccm	—	—	6,23	5,66	2,80	2,75	3,51	3,65	5,34	5,25	6,27	5,86	7,97	7,65
Verbr. NaOH i. ccm n. 2 Tg.*	8,21	7,69	4,72	4,06	3,28	3,42	4,53	4,35	6,02	6,30	7,03	7,25	8,88	8,30
NaOH n. Kor. i. ccm	7,98	7,46	4,16	3,50	2,59	2,73	3,52	3,34	4,64	4,90	5,24	5,46	6,46	5,88
Verbr. NaOH i. ccm n. 4 Tg.*	—	—	—	—	3,43	3,40	—	—	6,43	6,63	7,93	7,94	8,82	9,20
NaOH n. Kor. i. ccm	—	—	—	—	2,68	2,65	—	—	4,56	4,76	5,55	5,56	6,12	6,50
Synth. n. 1 Tg. i. % [1]	—	—	32,7	38,8	69,7	70,3	62,1	60,5	42,3	43,2	32,2	36,7	13,8	17,3
Synth. n. 2 Tg. i. % [1]	13,7	19,3	55,0	62,2	72,0	70,5	61,9	63,9	50,0	47,0	43,3	41,0	30,2	36,4
Synth. n. 4 Tg. i. % [1]	—	—	—	—	71,0	71,3	—	—	50,7	48,5	40,0	39,9	33,8	29,7
Mittelw. d. Synt. n. 1 Tg. i. % [1]	—		36		70		61		43		34		16	
Mittelw. d. Synt. n. 2 Tg. i. % [1]	17		59		71		63		49		42		33	
Mittelw. d. Synt. n. 4 Tg. i. % [1]	—		—		71		—		50		40		32	

*) Die Oelsäure wurde mit n/10 NaOH titriert.

**) Diese Werte wurden als Korrektur von dem Gesamttitrationswert abgezogen und so der auf die Oelsäure fallende Wert errechnet.

[1] Bezogen auf die ursprünglichen Oelsäuremengen = 100

Tabelle 5

Volumen der Reaktionsflüssigkeit = 75 ccm Glycerin mit einem Wassergehalt von 30 - 52%.

0,2 ccm n-Buttersäure

0,75 g Schweinspankreastrockenpulver.

Beim Schütteln des Fermentpulvers mit Glycerin wurden folgende Titrationswerte gefunden:

Wassergeh. d. Glyc. i/%	30	38	52
Zeit sofort	1,10	1,23	1,20
nach 2 Tagen	1,92	2,02	2,12
nach 4 Tagen	2,48	2,40	2,56

Diese Werte (bez. auf 20 g Gemisch) wurden als Korrektur von dem gesamten Titrationswert abgezogen und so der auf die Buttersäure entfallende, Wert errechnet. Die Buttersäure wurde mit n/20 NaOH titriert. Berechnet wurde auf 20 g Gemisch.

Wassergeh. d. Glyc. in %	30		38		52	
Zeit 0						
Einw. d. Gem. in g	31,4	30,0	26,8	24,0	25,0	23,6
Verbr. NaOH in ccm	17,93	17,50	16,39	15,66	17,71	16,08
NaOH a. 20 g Gem.	11,42	11,70	12,23	13,05	14,15	13,63
NaOH n. Kor. in ccm	10,32	10,60	11,00	11,82	12,95	12,43
Zeit 2 Tage						
Einw. d. Gem. in g	33,6	32,4	29,0	26,6	22,4	24,0
Verbr. NaOH in ccm	9,12	8,55	11,63	10,97	12,53	12,47
NaOH auf 20 g Gem.	5,43	5,28	8,02	8,25	11,19	10,39
NaOH n. Kor. ccm	3,51	3,36	6,00	6,23	9,07	8,27
Zeit 4 Tage						
Einw. d. Gem. in g	30,8	29,6	30,2	32,4	26,4	22,0
Verbr. NaOH in ccm	9,50	8,87	13,51	14,59	16,00	12,78
NaOH auf 20 g Gem.	6,17	5,99	8,95	9,00	12,12	11,62
NaOH n. Kor. in ccm	3,69	3,51	6,55	6,60	9,56	9,06
Synth. n. 2. Tg. in %[1]	66,0	68,3	45,5	47,3	30,0	33,5
Synth. n. 4. Tg. in %[1]	64,2	66,9	40,5	44,2	26,2	27,1
Mittelw. d. Synth. n. 2 Tg. in %[1]	67		46		32	
Mittelw. d. Synth. n. 4 Tg. in %[1]	66		43		27	

[1]) Bezogen auf die ursprüngliche Buttersäuremenge = 100

Für die Synthese von Glycerinestern ist die Anwesenheit einer gewissen Menge Wasser notwendig. Ob das Wasser aktivierend auf die Synthese wirkt, oder einfach die Konsistenz des Substrates sich dadurch günstiger gestaltet, ist schwer zu entscheiden. Wir glauben, daß in diesem Falle das letztere zutrifft, weil das wasserfreie Glycerin sehr zähe ist und das Glycerin-Säure-Ferment-Gemisch schlecht durchgerührt wird und deshalb nur langsam in Reaktion treten kann.

In Tabelle 5 fällt uns der scheinbar höhere (32 gegen 27) Synthesewert nach 2 Tagen als nach 4 Tagen bei 52% Wassergehalt auf. Dieses Verhalten ist wohl folgendermaßen zu erklären: Um den prozentualen Synthesegrad zu errechnen, zieht man denjenigen Wert der Säure ab, der aus dem Schweinepankreaspulver beim Schütteln abgegeben wird. Diese, vom Fermentpulver her stammende Säuremenge (wohl Fettsäuren) ist aber größer, wenn das Medium selbst Säure enthält, also in unserem Falle Buttersäure. Daher ist der aus dem buttersäurefreiem Versuch gewonnene Blindwert für die „Fermentsäure" anscheinend zu gering.

Um eine möglichst weitgehende Veresterung zu erreichen, muß man also die Fermentkonzentration ziemlich hoch, die Säurekonzentration relativ niedrig und die Wasserkonzentration von etwa 15% halten.

Der Gang der Synthesen ist bei günstiger Säurekonzentrationen etwa folgender:

Tabelle 6

150 ccm Glycerin (87%)
0,3 ccm n-Buttersäure (ca n/50)
1,5 g Schweinepankreastrockenpulver (ca 1%)

			Mittelwerte
Synth. n. 2 Std. i. %	17,4	12,5	15
„ „ 4 „ „ „	28,8	24,5	27
„ „ 6 „ „ „	37,1	36,4	37
„ „ 8 „ „ „	48,6	54,0	51
„ „ 24 „ „ „	72,9	70,6	72

Tabelle 7

10 ccm Glycerin
0,3 ccm Oelsäure
0,1 g Schweinepankreastrockenpulver

			Mittelwerte
Synth. n. 2 Std. i. %	13,4	17,7	16
„ „ 4 „ „ „	30,2	28,9	30
„ „ 6 „ „ „	44,7	42,0	43
„ „ 8 „ „ „	47,6	52,2	50
„ „ 24 „ „ „	68,9	70,5	70

Trägt man diese Werte graphisch auf, so sieht man den üblichen Reaktionsverlauf: das erste Stück der Kurve ist beinahe eine Gerade, die sich langsam krümmt und flach dem Gleichgewicht zustrebt [1].

Ferner versuchten wir die festen Säuren Palmitin- und Stearinsäure zu synthetisieren. Wir nahmen an, daß diese als schwache, in Glycerin unlöslichen Säuren, das Ferment nicht angreifen würden, und hofften damit ganz gute Synthesen erzielen zu können. Der Erfolg war aber umgekehrt. Wir erreichten nach 3-4 Tagen bei Palmitinsäure Synthesen zwischen 20-30% und bei Stearinsäure zwischen 18 und 25%, dabei schwankten die Werte stark und die Parallelversuche stimmten nur in weiten Grenzen überein. Der Grund dafür ist wohl in der schlechten Durchmischbarkeit zu suchen. Die kristallisierten Säuren klumpten sich mit dem Fermentpulver zusammen und wurden nur schlecht mit dem Glycerin durchgeschüttelt, wogegen die flüssige Oelsäure eine gut verteilte Emulsion in Glycerin gab [2].

[1] Hierzu wäre zu bemerken, daß die Messungen der letzten Ergebnisse nur sehr ungenau gemacht werden konnten, was aus dem experimentellen Teil, weiter unten, ersichtlich sein wird.

[2] Als anderes Ferment neben Schweinepankreastrockenpulver benutzten wir einmal auch Schweinelebertrockenpulver; wir erhielten Synthesen, jedoch sehr geringe, bei denselben Fermentkonzentrationen nur etwa einzehntel der Synthesewerte von Pankreas.

b) Synthese von Glycerinestern mit Hilfe von Glycerinrohextrakten aus Schweinepankreastrockenpulver.

Nach den Studien der Synthesen mit Schweinepankreastrockenpulver gingen wir dazu über, dasselbe mit Glycerinfermentextrakten zu verfolgen. Es war von Interesse Synthesen im homogenen System, hauptsächlich mit hoch gereinigtem Ferment, zu untersuchen. Die Synthesen in Lösungen sind vorläufig überhaupt nur in Glycerinextrakten möglich.

Wir untersuchten die Glycerinrohextrakte von Schweinepankreastrockenpulver. Es entstand zuerst die Frage, ob die absolute Menge des angewandten Trockenpulvers einen Unterschied in der Synthesekraft ausmacht.

Wir lösten 1,3 und 5 Gewichtsprozente vom Pulver in Glycerin und prüften die Stärke der synthetisierenden Wirkung; sie verhielt sich ungefähr wie 2 : 4 : 5. Mehr als 5 $^0_0$ige Lösungen ergaben keinen wesentlichen Unterschied gegenüber der 5 $^0_0$igen. Wir benutzten also immer eine ca. 5 $^0_0$ige Lösung. Die große Fermentkonzentration war wegen der noch stärkeren Angreifbarkeit des gelösten Fermentes durch freie Säure notwendig, um gute Synthesen zu erzielen. Somit sind die Vergleiche mit den Pulverversuchen, wo wir durchschnittlich 0,8 Gewichtsprozent Trockenpulver anwandten, quantitativ nicht durchführbar.

Im Ganzen betrachtet bekommen wir ein ungefähr gleiches Bild.

Die Abhängigkeit von der Säurekonzentration erwies sich bei entsprechenden Dosierungen nicht so ausgeprägt, was auf die absolut größere Fermentmenge der Rohextrakte zurückzuführen ist.

Tabelle 8

50 ccm Glycerinfermentextrakt
0,1 - 0,2 ccm n-Buttersäure (ca n/50 - n/25)

Wert der Säure aus dem Ferment
20 g Glycerinextrakt = 5,20 ccm n/20 NaOH

Dieser Wert wurde als Korrektur von dem Gesamttitrationswert abgezogen und so der auf die Buttersäure fallende Wert errechnet.

Die Buttersäure wurde mit n/20 NaOH titriert. Berechnet wurde auf 20 g Gemisch.

Säure in ccm	0,1		0,2	
Einw. d. Gem. in g Zeit 0	18,58	15,66	18,00	19,43
Verbr. NaOH in ccm	11,24	9,16	15,64	16,68
NaOH auf 20 g Gem.	12,12	11,68	17,36	17,16
NaOH n. Kor. in ccm	6.92	6,48	12,16	11,96
Einw. d. Gem. Zeit i.g 2 Tg.	20,20	17,84	19,53	16,55
Verbr. NaOH in ccm	8,20	7,00	10,94	9,30
NaOH auf 20 g Gem.	8,12	7,84	11,16	11,24
NaOH n.Kor. in ccm	2,92	2,64	5,96	6,04
Einw. d. Gem. i.g Zeit 4 Tg.	15,92	14,79	14,83	18,04
Verbr. NaOH in ccm	6,36	5,86	8,04	9,85
NaOH auf 20 g Gem.	8,00	7,92	10,84	10,92
NaOH n.Kor. in ccm	2,80	2,72	5,64	5,72
Synth. n. 2 Tg. in %	57,8	59,2	51,0	49,5
„ „ 4 „ „ „	59,2	58,0	53,6	52,2
Mittelw. d. Synth. n.2 Tg.	59		50	
„ „ „ „ 4 „	59		53	

Tabelle 9

10 ccm Glycerinfermentextrakt
0,3-2,0 ccm Oelsäure (ca n/10-n-$^2/_3$)

Säure in ccm	0,3	1,0	2,0
Synth. n. 1 Tg. in %	65	64	61
„ „ 2 „ „ „	—	—	65

Ein interessantes Bild zeigt die Variation der Fermentmenge: wir ersehen aus der Tabelle 10 welche äußerst geringen Mengen schon die Synthese bewirken können.

Abgewogene Mengen von Rohextrakt wurden mit gewöhnlichem Glycerin verdünnt, das Gesamtgewicht des Glycerins betrug immer 10 g.

Tabelle 10

10 g Glycerin (davon 0,3 - 10 g Extrakt 5%ig)
0,5 ccm Oelsäure (ca n/5)

Fermentextraktanteil i.%	100	10	5	3
Synth. n. 1 Tag in %	64	52	30	15
„ „ 2 „ „ „	—	60	—	—

Wir sehen, daß ein 3 % iger Rohextraktanteil eine Synthese von 15 % bewirken kann.

Die schädigende Wirkung des Wassers geht aus Tabelle 11 hervor.

Tabelle 11

15 g Glycerinextrakt mit 13—57 % Wasser.
0,5 ccm Oelsäure

Wassergeh. d. Glycerin i. %	13	30	42	57
Synth. nach 1 Tag i. %	64	34	21	0

c) Synthese von Glycerinestern mit Hilfe von gereinigten Glycerinextrakten (Eluaten).

Ferner untersuchten wir die Synthesebedingungen mit gereinigten Extrakten. Wir hielten uns dabei an dieselben Herstellungsmethoden, wie bei der Herstellung von Lipaseextrakten für Hydrolyse verwandt werden, d. h. Adsorption an Aluminiumhydroxyd und Elution mit Ammoniumphosphat-Glycerinlösung.[1])

Nur waren die Extrakte wegen des sehr großen Wassergehaltes für Synthesen von vornherein nicht gut brauchbar. Wir eluierten deswegen mit sehr kleinen Portionen der Elutionsflüssigkeit (enthaltend 40 % gewöhnlichen Glycerins) und verdünnten diese Extrakte mit Glycerin; dadurch wurde der Wassergehalt reduziert. Durch Ausprobieren gelang es uns, die geeigneten Mengen Elutionsflüssigkeit zu finden, und wir erhielten sehr starke, gut synthetisierende Fermentlösungen.

Die Synthesebedingungen untersuchten wir wieder nach denselben Richtungen wie vorhin, zuerst mit dem durch einmalige Adsorption und Elution gereinigtem Ferment. Es ist hierbei zu bemerken, daß die Werte bei verschiedenen Reinigungsansätzen, obgleich die Bedingungen nach Möglichkeit genau eingehalten wurden, sehr schwankend ausfielen. Dies ist jedoch durchaus verständlich, wenn man bedenkt, von wievielen Bedingungen die Reinigung abhängt (Durchschütteln, gutes oder

[1]) Rona, Fermentmethoden, 112—113 (1931).

weniger gründliches Waschen des Adsorbates in der Elutionsflüssigkeit usw.).

Zuerst untersuchten wir die Abhängigkeit von der Fermentkonzentration. In den folgenden Tabellen bringen wir die Ergebnisse einer durch einmalige Adsorption und Elution gereinigten Lipase. Wir erhielten Eluate mit 80 Teilen 87 %igen Glycerins und 20 Teilen Wasser (ca. 72 Gewichts% Glycerin). Diese Eluate verdünnten wir weiter mit Glycerin und bekamen so Lösungen von einem Gehalt bis zu 10 % Eluattlüssigkeit. Sie enthielten 2-20% überschüssiges Wasser, der Gesamtgehalt betrug 14-28 Gewichts% Wasser.

Tabelle 12

10 g Glycerin (davon 1-5 g Extrakt)
0,5 ccm Oelsäure

Fermentlösung in g	1	2,5	5
Synth. n. 1 Tag i.%	—	34	35
„ „ 2 Tg. „	32	61	49
„ „ 4 „ „	40	62	57

Tabelle 13

200 g Glycerin, (davon 50-200 g Extrakt)
0,25 ccm Buttersäure

Fermentlösung in g	50	100	200
Synth. n. 1 Tag in %	6	7	17
„ „ 2 Tg. „ „	7	14	31
„ „ 4 „ „ „	9	24	43

Bemerkenswert ist die außerordentlich gute Synthesekraft der Eluate. Wir erreichten Synthesen bis zu 40 bzw. bis zu 60%.

Die Variation der Säurekonzentration, Tabellen 14 und 15 zeigen wieder dasselbe Bild, wie bei Pulver- bzw. Rohextraktversuchen.

Tabelle 14

10 g Glycerin (2,5 g Eluat und 7,5 g Glycerin)
0,5-2,5 ccm Oelsäure (ca n/5-n/1)

Säure in ccm	0,5	1,25	2,5
Synth. n. 1 Tag in %	34	42	19
„ „ 2 Tg. „ „	61	53	22
„ „ 4 „ „ „	62	59	24

Tabelle 15

200 g Glycerinextrakt
0,25-0,75 ccm n-Buttersäure (ca n/80-n/25)

Säure in ccm	0,25	0,50	0,75
Synth. n. 1 Tag in %	23	—	—
„ „ 2 Tg. „ „	34	32	8
„ „ 4 „ „ „	41	43	12

Der schädigende Einfluß der freien Säure prägt sich auch hier aus. Er ist sogar noch stärker als bei den Pulverversuchen, was bei der Labilität des Fermentes in den Eluaten verständlich ist.

Wir versuchten die Lipase weiter zu reinigen, indem wir noch einmal an Aluminiumhydroxyd bezw. an Kaolin adsorbierten und eluierten. (3 malige Reinigung!) Dazu wäre einiges Prinzipielle zu bemerken, was bereits aus dem Studium der Lipaseextrakte für Hydrolyse Zwecke bekannt ist: durch nochmalige Adsorption wird nämlich das Ferment zwar reiner, aber dabei bedeutend weniger absolut genommen konzentriert. Außerdem wird es bedeutend empfindlicher. Nach einer sehr kurzen Zeit wird selbst für Hydrolysezwecke das wiederholt gereinigte Ferment, trotz der Aufbewahrung bei 0° gelegentlich inaktiv.

Wir eluierten so, daß die auf das Gesamtvolumen bezogenen Mengen mit gleichem Volumen Eluatflüssigkeit behandelt wurden.

Tabelle 16

10 g Glycerin (davon 1—5 g Extrakt, 2 mal adsorbiert und eluiert) 0,5 ccm Oelsäure

Fermentlös. in g	1,0	2,5	5,0
Synth. n. 2 Tg. in %	12	12	13
„ „ 4 „ „ „	21	22	22

Tabelle 17

10 g Glycerin (davon 1—5 g Extrakt, 3 mal adsorbiert und eluiert) 0,5 ccm Oelsäure

Fermentlös. in g	1,0	2,5	5,0
Synth. n. 2 Tg. in %	0	8	7
„ „ 4 „ „ „	12	12	15

Der Einfluß der Fermentmengen ist bei dieser schwachen Wirksamkeit nicht mehr ersichtlich; nur bei dem 3 mal gereinigten Ferment ist trotz des größeren Wasserüberschusses bei einer höheren Fermentkonzentration eine etwas bessere Synthese zu verzeichnen.

Stellt man die entsprechenden Werte aus demselben Ansatz zusammen, so bekommt man ein Bild dieser Verhältnisse. Der Vergleich der Wirkungen des 1, 2 und 3 mal gereinigten Ferments ist aus Tabelle 18 zu ersehen.

Tabelle 18

10 g Glycerin (davon 2,5 g Extrakt) 0,5 ccm Oelsäure

Anz. d. Reinigungen	I	II	III
Synth. n. 2 Tg. in %	61	12	8
„ „ 4 „ „ „	64	21	12

Man sieht, daß der Unterschied sehr groß ist. Die Wirksamkeit nimmt ab, man kann aber trotzdem eine, wenn auch nur schwache Synthese bei dem 3 mal gereinigten Ferment verzeichnen.

Experimenteller Teil

Als Ferment wurde Schweinepankreastrockenpulver verwendet, welches nach der bekannten Methode durch Behandlung mit Aceton und Aether gewonnen wurde. Für die Pulverversuche gebrauchten wir immer denselben Ansatz.

Als Reagenzien benutzten wir:

Glycerin (bidest. 1, 23 D. A. B. 6) Kahlbaum
n-Buttersäure (reinst) „
Oelsäure „ „

Die Synthesen wurden in kleinen enghalsigen Flaschen mit Gummistopfen angesetzt und in einem Thermostaten bei 37—38° Tag und Nacht geschüttelt.

Die Ansätze mit n-Buttersäure wurden folgendermaßen gemacht: Glycerin, Ferment und Säure, (aus einer Meßpipette zugegeben) wurden kräftig durchgeschüttelt. In bestimmten Intervallen wurde von einem Teil des Ansatzes das Fermentpulver abzentrifugiert. Von der überstehenden, schwach trüben Lösung wurden 10—20 g eingewogen, mit Wasser verdünnt, mit ein wenig Talkum versetzt aufgekocht und gegen n 10 bis n 20 Natronlauge mit Bromthymolblau als Indicator titriert. Die Zugabe von Talkum und das Aufkochen der Lösung bezweckt folgendes: das gelöste Eiweiß erzeugt beim Verdünnen mit Wasser eine starke gelbliche Trübung, sodaß der Umschlagspunkt des Indikators sehr unscharf wird, was bei den relativ geringeren Säurewerten, die wir zu titrieren haben, eine große Fehlerquelle bedeutet. Das Talkum adsorbiert, das beim Verdünnen mit Wasser und Aufkochen ausgeflockte Eiweiß, der schwere Niederschlag setzt sich am Boden ab, und bei der überstehenden fast klaren Lösung läßt sich der Umschlag sehr genau erkennen.

Nun ergibt sich noch eine Schwierigkeit, welche die Genauigkeit auch sehr stark beeinträchtigt. Es ist die „Fermentsäure", die während des Schüttelns in Lösung geht. Es ist daher

notwendig einen Blindversuch ohne Buttersäure daneben einzuschalten und den Wert, der aus dem Schweinepankreas stammenden Säure jeweils zu subtrahieren. Daß dabei, besonders bei geringen Aciditäten, beträchtliche Fehler entstehen können, ist durchaus verständlich (s. Tab. 1-7).

Die Ansätze mit Oelsäure müssen, da die Säure in Glycerin nicht löslich ist, anders gemacht werden. Sie werden für jede Abnahme einzeln in kleinen Flaschen mit ca. 10 ccm Glycerin angesetzt. Die Oelsäure wird aus einer Mikrobürette auf 0,002-0,005 ccm genau zugegeben. Der Titerwert der Säure wird genau ermittelt. Bei Abnahme wird der ganze Flascheninhalt mit Alkohol herausgespült und zusammen mit dem Fermentpulver nach Zugabe von Talkum auf dem Wasserbade erhitzt und gegen wässerige n/10 NaOH titriert. Auch hier ist selbstverständlich der Blindwert der „Fermentsäure“ in Rechnung zu ziehen.

Alle Versuche wurden in 2 Parallelen angesetzt; der Mittelwert wurde angegeben.

Die Glycerinrohextrakte wurden folgendermaßen hergestellt: die Aufschlemmung von 5 g Schweinepankreastrockenpulver in 100 g Glycerin wurde einen Tag lang im Brutschrank geschüttelt, das Fermentpulver abzentrifugiert und die noch stark trübe Lösung bis zur vollkommenen Klarheit durch ein Faltenfilter filtriert. Dabei genügte eine einmalige Filtration, wenn man die zuerst durchfiltrierten, schwach trüben Mengen zurückgießt.

Zur Reinigung [1] wurden 100 ccm Rohextrakt mit 500 ccm Wasser verdünnt, mit 6 ccm n-Essigsäure angesäuert und an Aluminiumhydroxyd 100 ccm (B-Lösung [2] enthaltend ca 1,4 g Al_2O_3) adsorbiert. Die Mischung wurde kräftig geschüttelt und abzentrifugiert. Das Adsorbat wurde mit 300 ccm 20%igem Glycerin gewaschen. Jedoch empfiehlt es sich dabei, nicht zu stark durchzurühren, da die Aktivität des Präparates davon erheblich beeinträchtigt wird. Nach dem Abzentrifugieren der Waschflüssigkeit eluierten wir zweimal mit 30 ccm „Ammonphosphat“ (57 Teile 1%iger sekundärer Ammoniumphosphatlösung, 3 Teile n-Ammoniak, 40 Teile 87%igen Glycerins) und versetzten die vollständig

[1] Rona, Fermentmethoden, 112-113 (1931)
[2] B. 56, 150 (1923)

klar abzentrifugierte Lösung mit 120 ccm 87%igen Glycerin (20 Vol. % übersch. Wasser bzw. 28 Gew. % absolut gerechnet).

Zur weiteren Reinigung wurde das erste Adsorbat mit 200 ccm „Ammonphosphat" eluiert und mit Wasser verdünnt. Das Phosphat würde die weitere Adsorption stören und wird deswegen mit Magnesia-Mischung als Magnesiumammoniumphosphat gefällt. Nach Absaugen des Niederschlages säuerten wir mit Essigsäure an und adsorbierten das Ferment wieder an Aluminiumhydroxyd B. Wir eluierten mit „Ammoniumphosphat" für Syntheseansätze mit kleinen Mengen, die wir mit Glycerin eluierten, zur weiteren Reinigung mit größeren. Zur dritten Adsorption wurde mit Essigsäure angesäuert und die (phosphathaltige) Lösung mit einer wässerigen Suspension von Kaolin behandelt. Nach Abtrennen des Adsorbates wurde wieder mit kleineren Mengen „Ammonphosphat" eluiert.

Die Ansätze wurden in der oben angegebenen Weise gemacht. Bei Rohextrakten wurde der Wert der „Fermentsäure" (s. Tab. 8) von vornherein bestimmt. Ihre Werte waren bei verschiedenen Ansätzen schwankend.

Bei den Eluatansätzen erübrigte sich der Zusatz von Talkum. Diese Eluatlösungen reagierten alkalisch ($2^1{}_3$ bas. Ammoniumphosphat). Durch die große Verdünnung mit Glycerin bei der Bestimmung des Synthesegrades wurde diese Alkalität jedoch sehr gering und brauchte bei der Berechnung der Oelsäureansätze nicht berücksichtigt zu werden.

II. Untersuchung der fermentativ gebildeten Glycerinester.

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit die Bedingungen für die fermentativen Synthesen der Glycerinester durch systematische Untersuchungen des Verlaufs des Reaktion eingehend geschildert worden sind, beschäftigen wir uns im folgenden Teil mit der gebildeten Ester. Die Angaben über die Endprodukte sind in der Literatur sehr lückenhaft und widersprechend.

Die Isolierung der Buttersäureester war von vornherein nicht erreichbar, da die Synthese nur bei niederen Konzentrationen stattfindet und deswegen nur sehr schlechte Ausbeuten liefert. Wir beschäftigten uns nur mit Oelsäureestern.

a) Allgemeines über die Trennung der fermentativen Oelsäureester.

Naturgemäß ist die Trennung derart komplizierter Gemische, wie sie bei der fermentativen Synthese entstehen, mit großen Schwierigkeiten verbunden. Es wird verschiedentlich in der Literatur darauf hingewiesen, daß Oelsäureglycerinester, sowohl die chemisch wie die fermentativ dargestellten, nicht destillierbar sind. Durch ein Experiment überzeugten wir uns von der Richtigkeit dieser Angabe. Im Hochvacuum begann bei ca 250-300° Außentemperatur der fermentativ gewonnene Ester zu sieden, dabei entwickelten sich gasförmige Zersetzungsprodukte. Wir erhöhten die Temperatur bis 400°. Es destillierten auch einige dunkelgefärbte Tropfen über, ein fester brauner Rückstand blieb im Kolben zurück; das Estergemisch ist also nicht destillierbar.

Auch fraktionierte Kristallisation erwies sich als unmöglich, weil der fermentativ dargestellte Ester bei tiefen Temperaturen auch bei vorsichtiger Behandlung nur ölig erstarrte. Es blieb nur noch der Weg, etwa vorhandene, verschiedene Löslichkeiten der einzelnen Komponenten zur Trennung zu benutzen. In Gemischen dieser Art beeinflussen sich aber die Löslichkeiten der Bestandteile gegenseitig sehr stark; deshalb stellten wir auf preparativem

Wege Mono-, Di- und Triolein her, um die Eigenschaften dieser Produkte kennenzulernen und sie dann für die Trennung unserer fermentativen Endprodukte nutzbar zu machen.

b) Darstellung der Oelsäureester auf chemischem Wege.

Es gibt bereits ausgezeichnet ausgearbeitete Methoden zur Darstellung partiell acylierten Glycerins. Von den vier Formen des Mono- und Diesters wählten wir das α-Monoolein und das α,β-Diolein. Das letzte ist in der Literatur überhaupt noch nicht beschrieben worden.

Bei der Darstellung des Monooleins verfuhren wir nach den Methoden von E. Fischer. [1]) Die zwei benachbarten Hydroxylgruppen des Glycerins wurden durch Aceton besetzt. Dazu schüttelt man das wasserfreie Glycerin mit einem Ueberschuß von salzsäurehaltigem Aceton in Gegenwart von Trockenmitteln eine längere Zeit. Durch Neutralisation der Säure, Abdestillieren des Acetons und Fraktionieren im Vacuum bekommt man ein sehr reines Produkt. Die noch freie α-ständige Hydroxylgruppe wird mit Oelsäurechlorid in Pyridin verestert.

Das Säurechlorid wird nach der Methode von Adams und Ulich [2]) mittels Oxalylchlorid dargestellt. Der Verlauf der Reaktion ist nach Angaben der Autoren folgendermaßen:

$$2\,R\,COOH + (COCl)_2 = (R\,COO\,CO)_2 + 2\,HCl$$
$$(R\,COO\,CO)_2 = (R\,CO)_2O + CO_2 + CO$$
$$(R\,CO)_2O + (COCl)_2 \quad 2RCOCl + CO_2 + CO$$

Die Darstellungsmethode ist außerordentlich einfach, man bekommt ein sehr reines Produkt. Die Autoren geben 2 Arten der Darstellung an: Einwirken des Oxalylchlorids, entweder auf

[1] a) E. Fischer, M. Bergmann, Bärwind, B 53, 1588-1621
b) Averill, Roche, King. Journ. Amer. Chem. Soc. 51, 866
c) Fairbourne, Forster. Journ. of Chem. Soc., London 1926, 3146
d) M. Bergmann, Brand. Dreyer B. 54, 936
e) Helferich, Sieber, Ztschr. f. Phys. Chemie 170, 31
f) M. Bergmann, Carter. daselbst 191, 211

[2] Journ. Amer. Chem. Soc. 42, 599

die organische Säure oder auf das in Benzol gelöste Natriumsalz; dabei geben sie nicht an, bei welchen Produkten die eine oder die andere Methode vorzuziehen ist. Bei unserem Studium ergab es sich, daß die Methode mit dem Natriumsalz unbedingt geeigneter ist.[1] Die freie Säure wird zu leicht durch das Oxalylchlorid angegriffen.

Durch Hochvakuumdestillation (bei ca. 150°) erhält man das Oelsäurechlorid in reinem Zustand.

Das Aceton des Aceton-glycerin-oleats wurde in ätherischer Lösung mit konz. Salzsäure bei 0° abgespalten.[2] Das α-Monooleat wurde aus Petroläther umkristallisiert.

Das α, β-Dioleat wurde nach den Methoden von Helferich dargestellt[3]. Man veräthert eine α ständige Hydroxylgruppe des Glycerins in Pyridinlösung mit dem „Tritylrest" durch Behandlung mit einem Unterschuß von Triphenylchlormethan. Darauf oleiert man wieder in Pyridinlösung die übrigen 2 Hydroxylgruppen mit Oelsäurechlorid. Das Mono-trityl-di-oleyl-glycerin wird aus Alkohol umkristallisiert Die Abspaltung des Tritylrestes geschieht durch Behandlung des Produktes mit konz. Bromwasserstoff-eisessig-lösung bei 0°.

Das Triolein stellten wir auch auf dem synthetischen Wege dar. Das käufliche Produkt schien uns in Bezug auf seine Reinheit und Einheitlichkeit (Beimengungen von gesättigten Säuren usw.) nicht sicher genug, besonders wenn man berücksichtigt, daß es kaum Methoden zur Reinigung dieser Oele gibt. Wir oleierten wasserfreies Glycerin in Pyridin mit überschüssigem Oelsäurechlorid.

Von der Richtigkeit der Veresterungsstufen dieser 3 Glyceride überzeugten wir uns durch Bestimmung ihrer freien Hydroxylgruppen durch Acetylierung.

Wir fanden bei Monoolein 9,3% Hydroxyl (statt 9,55), bei Diolein 3,1% (statt 2,74) und bei Triolein 0,0%.

Wir hatten diese verschiedenen Ester auf präparativem Wege dargestellt, um ihre Löslichkeiten zu bestimmen. Diese Kennt-

---

[1] Wir änderten die Darstellungsmethode insofern, daß wir, nach beendeter Reaktion, die Benzollösung mit Aether verdünnten. Dieses erwies sich zum bequemeren Abnutschen des NaCl günstig.

[2] B. 53, 1589

[3] B. 56, 766 und Ztschr. Phys. Chem. 170, 31

nisse benötigten wir zu der Trennung der fermentativ dargestellten Ester.

In den meisten organischen Lösungsmitteln waren die 3 Esterarten etwa gleich löslich. Dagegen war ihr Verhalten gegen wässerigen Alkohol verschieden. Während Monoolein in 50%igem Alkohol noch glatt löslich ist, ist Diolein nur in 80%igem und Triolein im 98%igem löslich. Diese Tatsache gab uns einen Anhalt bei der Trennung unseres fermentativen Estergemisches.

c) Analyse der isolierten Oelsäureester.

Wir isolierten den fermentativ gewonnenen Oelsäureester und bestimmten seinen Säurewert durch Verseifung.

Berechnet man die Gewichtsprozente der Acylreste im Molekül, so bekommt man für die 3 Esterarten folgende Zahlen:

Monoolein	74,5 %
Diolein	85,5 %
Triolein	89,8 %

Wir bekamen für unseren Ester aus einem Ansatz den Wert von 82,0 %.

Diese Methode ist jedoch zur Bestimmung der Veresterungsstufen sehr ungenau, denn der prozentuale Anteil der Oelsäure in den Estern unterscheidet sich nur sehr wenig voneinander. Genauer ist die Methode der Hydroxylzahlbestimmung, bei der sich der Unterschied der einzelnen Veresterungsstufen in der Analyse besser verfolgen läßt.

Der prozentuale Anteil der Hydroxylgruppen beträgt für

Monoolein	9,55 %
Diolein	2,74 %
Triolein	0,0 %.

Wir wandten bei unseren Bestimmungen die Methode der Hydroxylzahlbestimmung durch Acetylieren von Verley und Bölsing [1] an. Diese Methode beruht darauf, daß das Essigsäureanhydrid, in Pyridin gelöst, die freien Hydroxylgruppen acetyliert. Dabei entspricht ein halbes Mol Anhydrid einer Hydroxylgruppe. Das andere Molekül Essigsäure wird zu Pyridinacetat gebunden, das unverbrauchte Essigsäureanhydrid wird durch Wasser zu Essigsäure bzw. Pyridinacetat zersetzt. Diese unverbrauchte Essigsäure wird durch Natronlauge titriert. Aus der Menge verbrauchten

[1] B. 34, 3354; H. Meier, Anal. u. Konst. org. Verb. 336 (1931)

Essigsäureanhydrids berechneten wir den prozentualen Anteil der Hydroxylgruppen im Ester.

Die Analyse eines Esters von 82% Oelsäurewert ergab 3,6% Hydroxyl. Dieser Wert stimmt mit dem Säurewert ungefähr überein. Die Zahlen liegen zwischen denen von Mono- und Diolein, und zwar näher an Diolein.

Bei verschiedenen weitgeführten Synthesen und bei solcher mit längerer Reaktionsdauer, als zur Erreichung des Gleichgewichts notwendig wäre (2-3Tg.), bekamen wir annähernd dieselben Zahlen, nämlich 2,5-4,5% Hydroxyl.

Diese Werte lassen auf das Vorhandensein eines Gemisches der niederen Esterstufen schließen. Die Annahme der Anwesenheit des Trioleins in dem Gemisch erschien uns am wahrscheinlichsten.

d) Trennung des fermentativen Estergemisches.

Zur Trennung dieses Gemisches benutzten wir die schon obenerwähnten verschiedenen Löslichkeiten in wässerigem Alkohol. Beim geringen Verdünnen der absolut alkoholischen Lösung der Ester mit Wasser, fiel kein reines Triolein aus, sondern es kamen wieder Gemische zur Abscheidung. Es gelang uns durch einen Kunstgriff, in der nach Verdünnung ausgefällten Fraktion, das Triolein anzureichern. Wir haben beobachtet, daß Talkum suspendierte Oele zum Teil adsorbiert; dadurch ist die Möglichkeit einer besseren Trennung des Oeles gegeben.

Wir verfuhren folgendermaßen: die Oelsäureester wurden im abs. Alkohol gelöst und durch Wasserzusatz auf einen Gehalt von 90% Alkohol gebracht. Dann setzten wir eine größere Menge Talkum hinzu (ca. 25 g auf 15 g Estergemisch). Das Gemisch wurde eine halbe Stunde lang geschüttelt und abzentrifugiert Wir pipettierten die überstehende alkoh. Lösung ab und wuschen die Lösung zweimal mit 90-92%igem Alkohol. Die alkoh. Lösungen wurden vereinigt. Das Oel aus dem Talkum wurde mit Petrolaether durch Kochen des Gemisches auf dem Wasserbade extrahiert. Wir filtrierten vom Talkum ab und wuschen die Petrolätherlösung mehrere Male mit Wasser zur Entfernung des anhaftenden Alkohols. Die dabei entstehende Emulsion wurde durch Zusatz von Natriumchlorid beseitigt, die Petrolätherschicht im Scheidetrichter abgetrennt und abgedampft.

Die beim Abzentrifugieren überstehende wässerig-alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade eingedampft, mit Petroläther aufgenommen und genau so wie der andere Teil weiter verarbeitet.

Wir bekamen also 2 Fraktionen des Oeles. Bei dieser Trennungsmethode sind erhebliche Verluste unvermeidlich (Anhaften des Oels an Gefäßwänden, Emulsion im Wasser beim Waschen usw.).

Bei der Bestimmung des prozentualen Anteils der Hydroxylgruppen ergab sich eine beträchtliche Verschiebung der Werte:

vor der Trennung	3,6%
I. Teil unlös. i/Alk.	2,0%
II. Teil löslich i/Alk.	4,8%

Durch Wiederholung dieser Operation an dem Teil I bekamen wir für die Hydroxylgruppen folgende Werte:

vor der Trennung	2,0%
Teil unlös. i/Alk.	0,5%
Teil löslich i/Alk.	2,9%

Wiederholt man die Behandlung noch einmal, so bekommt man einen Wert von 0,1—0,2% Hydroxyl für den unlöslichen Anteil. Nun ist die Bestimmungsmethode bei tiefen Hydroxylwerten sehr ungenau; jedenfalls bekommt man hierbei reines oder annähernd reines Triolein. Damit ist auch die Gegenwart von diesem Ester im Gemisch bewiesen. Die Anwesenheit von Monoolein ist durch die Zahlen, die höher als diejenigen für Diolein liegen, gegeben und somit auch für Diolein selbst (Stufenreaktion).

Der fermentativ gebildete Ester kann also nur als ein Gemisch aller drei Arten angesehen werden.

Zusammenfassung.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Bedingungen untersucht, unter denen eine fermentative Synthese von Glycerinestern möglich ist. Es wurde dabei gefunden, daß der Verlauf der Synthese von Ferment-, Säure- und Wasserkonzentration abhängig ist, und zwar in dem Sinne, daß die Erhöhung der Fermentkonzentration günstig einwirkt, die Erhöhung der Säure- und Wasserkonzentrationen dagegen das Gleichgewicht nach der Seite der Hydrolyse verschiebt.

Die Lipase behält ihre esterifizierende Eigenschaft auch in Glycerinlösung. Es ist uns gelungen, auch mit gereinigten Fermentextrakten (Eluaten) gute Synthesen zu erzielen.

Die Frage, ob sich bei der fermentativen Veresterung eine oder mehrere Esterarten bilden, konnten wir dahin entscheiden, daß in dem Gemisch alle drei Arten vorliegen müssen.

Es gelang uns ferner eine ganz geeignete Trennungsmethode für Oelgemische durch lose Adsorption an Talkum der schwerer löslichen Arten zu finden.

Experimenteller Teil.

I. α-Monooleat.

1) Acetonglycerin.[1])

Das käufliche 87%ige Glycerin wurde durch Erhitzen im Vacuum auf 150° einen Tag lang unter Vorschaltung einer Vorlage mit P_2O_5 entwässert. Das Aceton wurde vorher mit $CaCl_2$ längere Zeit erhitzt und über $KMnO_4$ destilliert. Wir leiteten in das Aceton getrocknetes Salzsäuregas ein bis zu einer Gewichtszunahme von ca. 1%.

100 g Glycerin, 600 ccm salzsäurehaltiges Aceton und 40 g entw. Na_2SO_4 wurden einen Tag lang geschüttelt. Dann gaben wir 200 g $PbCO_3$ zu, um die Salzsäure zu neutralisieren. Die Lösung wurde abgesaugt und mit etwas Ag_2O versetzt (zur Entfernung der letzten HCl-Spuren), das Aceton im Vacuum abdestilliert und das Produkt fraktioniert.

Sdp. 84° bei 13 mm (nach Fischer 82,5° bei 11 mm).

2) Oelsäurechlorid.[2])

50 g Oxalylchlorid wurden in 125 ccm wasserfreiem Benzol in einem Rundkolben nach Anschütz, in dessen einer Oeffnung ein Kühler angebracht war, gelöst. Durch die 2. Oeffnung gaben wir 45 g gepulv. und bei 110—120° getrocknetes Natriumoleat in kleinen Portionen zu. Die Reaktion trat sofort ein. Nach Zugabe des Salzes erhitzten wir das Gemisch 2 Std. lang, zuerst auf 60—70 und dann auf 100°. Während der Reaktion empfiehlt es sich, Stickstoff in den Kolben einzuleiten, wegen der leichten Oxydierbarkeit des Produktes. Nach dem Erkalten des Reaktionsgemisches gaben wir noch ca 200 ccm Aether hinzu und saugten die Lösung bis zur vollkommenen Klarheit ab. Benzol bzw. Aether wurden im Vacuum abgedampft, das Produkt wurde zweimal im Hochvacuum fraktioniert. Bei 148–150° und 0,05 mm Druck ging ein beinahe farbloses, dünnflüssiges Oelsäurechlorid über.

1) B. **53**, 1606 (1920).
2) Journ. Amer. Chem. Soc. **1920**, 599.

3) Aceton-glycerin-oleat.[3])

10 g Acetonglycerin wurden in 30 ccm Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 23 g Oelsäurechlorid in kleinen Portionen versetzt. Das Reaktionsgemisch ließen wir einen Tag lang stehen, dann gossen wir es in verdünnte Schwefelsäure und nahmen das ausgefallene Oel mit Aether auf. Die ätherische Lösung wurde mit verdünnter H_2SO_4, H_2O und $NaHCO_3$-Lös. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und der Aether abdestilliert.

Das Acetonglycerinoleat ist ein hellgelbes Oel, das bei 0° zu farblosen Kristallen erstarrt; leicht löslich in Aether und Petroläther.

4) α-Monooleat.[3])

10 g Acetonglycerinoleat wurden in 50 ccm Aether gel. und unter Eiskühlung mit 50 ccm konz. HCl (D. 1,19) in kleinen Portionen versetzt. Das Gemisch ließ man einige Zeit in Eis stehen, dann wurden 200 ccm eiskaltes Wasser zugegeben; nach erneutem Stehen in Eis wurde die ätherische Schicht abgetrennt, mit Wasser und $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, getrocknet und der Aether abdestilliert. α-Monooleat kristallisiert in weißen Schuppen; nach dem Umkristallisieren aus Petroläther zeigte es einen Schmelzpunkt von 47—48°.

II. α,β-Dioleat.

1) Monotritylglycerin.[4])

40 g wasserfr. Glycerin, 60 g Triphenylchlormethan und 150 ccm Pyridin wurden in einer dunklen Flasche einen Tag lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann erwärmt man eine halbe Stunde lang auf dem Wasserbade. Die Weiterverarbeitung geschah genau wie beim Aceton-glycerin -mono-oleat. α-Monotrityl-glycerin ist ein kristallin erstarrendes Oel; nach dem Umkristallisieren aus Alkohol zeigt es einen Schmelzpunkt von 94° (desgl. i. d. Lit.).

2) α-Monotrityl-dioleylglycerin.[4])

Zu 10 g Tritylverbindung, in 20 ccm Pyridin gelöst, wurden 22 g Oelsäurechlorid unter Kühlung hinzugegeben. Die Weiterverarbeitung geschah wie oben. Das Monotrityl-dioleyl-glycerin ist ein hellgelbes Oel, das erst nach längerem Stehen aus der alkoholischen Lösung kristallin erstarrte. Der Schmelzpunkt lag zwischen 58 und 60°.

3) B. **53,** 1589 (1920); Journ. Amer. Chem. Soc. **51,** 866 (1929).
4) B. **56,** 766; Zs. f. phys. Chemie **170,** 34.

3) α,β-Diooleat.

5 g Tritylverbindung wurden in 30 ccm Eisessig und 20 ccm Aether gelöst und auf 0^0 abgekühlt. Nach Zusatz von 15 ccm HBr-Eisessiglösung wurde rasch durchgeschüttet und sogleich in Eiswasser eingegossen. Das Gemisch wurde mit Aether überschichtet, durchgeschüttelt, die ätherische Schicht abgehoben und mit einer Aufschwemmung von $NaHCO_3$ bis zur alkalischen Reaktion geschüttelt. Dann wurde mit Wasser gewaschen und getrocknet und der Aether abdestilliert. Als Rückstand blieb ein Gemisch von auskristallisiertem Tritylbromid und dem Ester zurück. Durch zweimaliges Aufnehmen in Petrolaether, Filtrieren und Abdampfen des Lösungsmittels bekamen wir den Ester frei von Tritylcarbinol. Er ist ein hellgelbes kristallin erstarrendes Oel.

III. Triolein.

3 g wasserfr. Glycerin wurden in der üblichen Weise in einer Pyridinlösung mit 35 g Säurechlorid in den Oleinsäureester verwandelt. Das Triolein ist ein gelbes dickflüssiges Oel.

Isolierung der fermentativ dargestellten Oelsäureester.

Den fermentativ dargestellten Ester isolierten wir auf folgende Art: die Ansätze wurden durchschnittlich mit 250 g Glycerin, 50 g Oelsäure und 2 g Schweinepankreastrockenpulver gemacht. Dieses Gemisch wurde, nachdem sich das Gleichgewicht eingestellt hatte, zusammen mit dem Fermentpulver, in 500 ccm absoluten Alkohol aufgenommen, mit alkoh. KOH bis zur deutlichen Alkalität versetzt; dann wurden 150 ccm Wasser zugegeben. Dieses Gemisch mit den darin durch Wasserzusatz suspendierten Oelteilchen wurde mit 500 ccm Petroläther in mehreren Operationen gründlich ausgeschüttelt. Der Wasserzusatz bezweckte erstens die Entmischung der Alkohol-Petroläther-Lösung und zweitens die Herabsetzung der Löslichkeit des Esters in Alkohol. Ein zu großer Wasserzusatz ist jedoch nicht zu empfehlen, da dadurch Emulsionen entstehen können.

Die Petrolätherlösung des Esters wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und der Petroläther abdestilliert. Zur Entfernung der letzten Reste von Petroläther und der evtl. Spuren von Alkohol wurde das Produkt im Hochvacuum auf dem Wasserbade unter Vorschaltung von P_2O_5 getrocknet.

Wir bekamen ein hellgelbes Oel, das in der Regel nach längerem Stehen zum kleinen Teil in weißen, zu Sternen angeordneten Nadeln auskristallisierte.

Aus 50 g Oelsäure wurden durchschnittlich 30—33 g Ester gewonnen, d. h. ca. 80—85% der Theorie.

Das Oel ist in Aether, Petroläther, Pyridin, Alkohol (bis zu 94—96%igem) löslich.

Analyse des fermentativen Oeles.

1) Verseifung.

0.5 g Substanz wurden in 70 ccm Alkohol gelöst und mit 10 ccm n-NaOH versetzt. Die Lösung wurde eine Stunde lang am Rückflußkühler auf dem Wasserbade gekocht, darauf mit 10 ccm n-HCl versetzt und mit n/10-NaOH titriert.

2) Bestimmung der Hydroxylzahl durch Acetylierung.[5])

Etwa 1 g Substanz versetzten wir mit 10 ccm eines Gemisches von 88% wasserfreiem Pyridin und 12% Essigsäureanhydrid (Sdp. 138—139°). Der Kolben wurde eine halbe Stunde lang auf dem Wasserbade am Rückflußkühler erwärmt und nach dem Spalten des Essigsäureanhydrids durch Wasser mit n/2-NaOH titriert.

Die vorliegende Arbeit ist in der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin in der Zeit von März 1932 bis zum April 1933 ausgeführt worden.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. P. Rona, der mich zu dieser Arbeit veranlaßte, für sein großes Interesse, daß er dem Fortschritt der Arbeit entgegengebracht hat, und für seine Ratschläge meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

5) B. 34, 3354; H. Meyer, Analyse u. Konst. organ. Verb. S. 336 (1931).

Lebenslauf.

Am 4. Mai 1908 wurde ich, Sarah Ginsburg, zu Petersburg in Rußland als Tochter des damaligen Bankdirektors M. Ginsburg geboren.

Von 1917 bis 1920 besuchte ich die Taganzew-Oberrealschule in Petersburg, dann 1921 ein halbes Jahr lang eine russische Schule in Riga (Lettland). Ab August 1922 besuchte ich das Hohenzollern-Lyzeum und Oberlyzeum zu Berlin-Wilmersdorf, wo ich Ostern 1929 das Abitur gemacht habe.

Seit dem Sommersemester 1929 beschäftigte ich mich mit dem Studium der Chemie an der hiesigen Friedrich-Wilhelms-Universität. Das anorganische und organische-chemische Praktikum sowie die Verbandsexamina machte ich bei Herrn Hofrat Professor Schlenk, das physikal.-chemische Praktikum und Examen bei Herrn Professor Bodenstein.

Franz Linke, Buchdruckerei, Berlin NW 6, Marienstr. 13